



Blodglukos och plasmainsulin vid två olika doseringar av SGLT2-hämmare till hästar diagnostiserade med ekvint metabolt syndrom

Blood glucose and plasma insulin at two different doses of SGLT2-inhibitors in horses diagnosed with equine metabolic syndrome

Sofia Vigren

Examensarbete/Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2021



Blodglukos och plasmainsulin vid två olika doseringar av SGLT2-hämmare till hästar diagnostiserade med ekvint metabolt syndrom

Blood glucose and plasma insulin at two different doses of SGLT2-inhibitors in horses diagnosed with equine metabolic syndrome

Sofia Vigren

Handledare: Johan Bröjer, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper
Examinator: Katarina Nostell, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska vetenskaper

Omfattning: 30 hp
Nivå och fördjupning: A2E
Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod: EX0869
Program/utbildning: Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala
Utgivningsår: 2021

Nyckelord: Ekvint metabolt syndrom, EMS, kanagliflozin, SGLT2-hämmare

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Ekvint metabolt syndrom, EMS, är en komplex sjukdom. Hästar med EMS har en onormal fett-metabolism, insulinresistens och ökad risk för fång. Just höga insulinnivåer i blodet har ett starkt samband med utvecklandet av fång.

Inom humanmedicinen finns en relativt ny läkemedelsgrupp, SGLT2-hämmare, som ny behandlingsstrategi för typ 2 Diabetes Mellitus. I stället för att direkt påverka det endogena insulinet binder detta läkemedel in till SGLT2 i proximala tubuli i njuren och hämmar därigenom glukosresorptionen.

SGLT2-hämmare har en framtid inom behandlingsstrategin för EMS hästar. Vi såg en viktnedgång hos tidigare svårbantade hästar. Tröskelvärdet i njuren för glukosuri sänktes vilket medförde lägre blodglukos vid fasta och stabilare glukosnivåer efter födointag och därigenom lägre plasmainsulinkoncentrationer. Kanagliflozin verkar även ha effekt på SGLT1 i tarmen. Sänkning av de postprandiella nivåerna av plasmainsulin är den huvudsakliga faktorn vid behandling av EMS sjuka hästar och motverkandet av fång.

Nyckelord: Ekvint metabolt syndrom, EMS, kanagliflozin, SGLT2-hämmare

Abstract

Equine metabolic syndrome, EMS, is a complex disease. Horses with EMS have an abnormal fat metabolism, insulin resistance and an increased risk of laminitis. High insulin levels in the blood have a strong connection with the development of laminitis.

In human medicine, there is a relatively new group of drugs, SGLT2-inhibitors, as a new treatment in type 2 Diabetes Mellitus. Instead of directly affecting the endogenous insulin, this drug binds to SGLT2 in the proximal tubules of the kidney, thereby inhibiting glucose resorption.

SGLT2-inhibitors have a future in the treatment strategy against EMS. We identified weight loss in horses that previously had difficulties to lose weight. The renal threshold for glucosuria was lowered, which resulted in lower blood glucose after fasting and more stable glucose levels after food intake, and thereby lower plasma insulin concentrations. Attenuating the postprandial insulin response is the key in treatment of insulin dysregulation and decreasing the risk of developing laminitis.

Keywords: Equine metabolic syndrome, EMS, canagliflozin, SGLT2-inhibitors

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	9
Figurförteckning.....	11
1. Inledning.....	13
2. Litteraturoversikt	14
2.1. Ekvint metabolt syndrom	14
2.1.1. Ökad fettmassa – lokal eller generell.....	14
2.1.2. Insulinresistens, IR,.....	15
2.1.3. Fång.....	15
2.2. Glukosreglering i njuren.....	16
2.2.1. SGLT2-hämmare inom humanmedicin.....	16
3. Material och metod	17
3.1. Uppställning och miljö.....	17
3.2. Försöksperiodens upplägg	18
3.2.1. Oralt glukostest, OGT dag 2 och 26	19
3.2.2. Meal toleranse test, MTT, dag 3 och 27	20
3.2.3. Graderad glukosinfusion, GGI, dag 4 och 28	20
3.3. Blodprovshantering och analys av prover	21
3.4. Statistik och beräkningar	21
4. Resultat.....	23
4.1. Vikt.....	23
4.2. Blodglukos	23
4.3. Plasmainsulin	26
4.4. Övriga resultat och analyser.....	29
5. Diskussion.....	31
5.1. Viktnedgång.....	31
5.2. Blodglukos	31
5.3. Plasmainsulin	32
5.4. Övriga parametrar och analyser.....	32

5.5.	Konklusion	33
5.6.	Slutsats	34
Referenser.....		36
Populärvetenskaplig sammanfattning		38
Bilagor		41

Tabellförteckning

Tabell 1. Samtliga deltagande hästar i studien med tilldelad bokstav, diagnostiseringsmetod i fält med insulin peak (mU/L), kön ras och ålder (år).....	17
Tabell 2. Glukosgiva vid de två olika OGT i milliliter med dosering på 0,5 ml/kg och baserat på hästens vikt i kilogram den aktuella dagen.....	19
Tabell 3. Hästarnas vikt registrerat vid OGT dag 2 och 26 med total viktminskning i kilogram och procent, samt minskning i kilogram per dygn mellan de två tillfällena.	23
Tabell 4. Arean under kurvan (AUC_{Glukos}) för blodglukos (mmol/L x min) vid OGT 1 innan behandling, och OGT 2 under behandling med kanagliflozin, samt sammanställning av minskning i procent (%).	25
Tabell 5. Skillnad i blodglukoskoncentrationen i mmol/L vid fasta innan (OGT 1) och under behandling (OGT 2) med kanagliflozin, samt minskning av blodglukoskoncentrationen i procent (%). Fluktuation blodglukos (mmol/L) mellan högsta och lägsta mätning av blodglukos efter oral glukosgiva under 190 minuter.	25
Tabell 6. Arean under kurvan ($AUC_{Insulin}$) för plasmainsulin (mU/L x min) vid OGT 1 innan behandling, och OGT 2 under behandling med kanagliflozin, samt sammanställning av minskning i procent (%).	27
Tabell 7. Skillnad i plasmainsulin i mU/L vid fasta innan (OGT 1) och efter behandling (OGT 2) med kanagliflozin, samt minskning av plasmainsulin vid fasta i procent (%). Fluktuation plasmainsulin (mU/L) mellan högsta och lägsta mätning av seruminsulin efter oral glukosgiva under 190 minuter.	27
Tabell 8. Övrig blodkemi analyserat i samband med MTT 1 innan behandling och MTT 2 under behandling med kanagliflozin, där A1 – E1 motsvarar blodprov taget vid MTT1 och A2 – E2 motsvarar blodprov taget vid MTT2. Analys av GLDH (nkat/L ref. 15-190), GGT (μ kat/L ref. 0,1-0,5), triglycerider (mmol/L ref. 0,1-0,5), protein (g/L ref. 56-72), natrium (mmol/L ref.133-145), kalium (mmol/L ref. 2,5-5,0) och klorider (mmol/L ref. 96-106). Siffror markerade i röd text motsvarar värden utanför angivna referensintervall.	30

Figurförteckning

- Figur 1. Individuella glukoskoncentrationer (mmol/L) för hästarna A – E under ett oralt glukostest (OGT) utfört före och under behandling med kanagliflozin. A1 – E1 visar hästarnas glukoskoncentrationer före behandling med kanagliflozin. A2 – E2 visa hästarnas glukoskoncentrationer under behandling med kanagliflozin och efter total behandlingstid på 24 dagar q24h.24
- Figur 2. Individuella plasmainsulinkoncentrationer (mU/L) för hästarna A – E under ett oralt glukostest (OGT) utfört före och under behandling med kanagliflozin. A1 – E1 visar hästarnas insulinkoncentrationer före behandling med kanagliflozin. A2 – E2 visa hästarnas insulinkoncentrationer under behandling med kanagliflozin och efter total behandlingstid på 24 dagar q24h.26
- Figur 3. Logaritmiskt förhållande mellan blodglukos och plasmainsulin vid OGT 1 innan behandling där A1 Glu – E1 Glu motsvarar häst A – E blodglukoskoncentrationer (mmol/L) vid OGT 1 innan behandling med kanagliflozin och A1 Ins – E1 Ins motsvarar häst A – E plasmainsulinkoncentrationer (mU/L) vid OGT 1 innan behandling med kanagliflozin.28
- Figur 4. Logaritmiskt förhållande mellan blodglukos och seruminsulin vid OGT 2 under behandling där A2 Glu – E2 Glu motsvarar häst A – E blodglukoskoncentrationer (mmol/L) vid OGT 2 under behandling med kanagliflozin och A2 Ins – E2 Ins motsvarar häst A – E plasmainsulinkoncentrationer (mU/L) vid OGT 2 under behandling med kanagliflozin.....29

1. Inledning

Ekvint metabolt syndrom, EMS, är ett komplex sjukdom. Hästar med EMS har en onormal fettmetabolism, insulinresistens och ökad risk för fång. Just höga insulin-nivåer i blodet har ett starkt samband med utvecklandet av fång. Idag behandlas sjukdomen främst med foderåtgärder där målet är att hålla låga och jämna glukos-nivåer i blodet för att just undvika insulinstegringar. Adekvata foderåtgärder är ofta svårt för hästägarna att följa och det finns en ständig oro att hästarna ska drabbas av fång.

Inom humanmedicinen finns en relativt ny läkemedelsgrupp, SGLT2-hämmare, som ny behandlingsstrategi för typ 2 Diabetes Mellitus. I stället för att direkt påverka det endogena insulinet binder detta läkemedel in till SGLT2 i proximala tubuli i njuren och hämmar därigenom glukosresorptionen. Resultatet blir att tröskelvärdet för glukosuri sänks. Hos människa ses sänkta nivåer fasteglukos samt postprandiellt blodglukos, viktninskning och sänkt blodtryck.

I denna studie behandlas fem EMS-sjuka hästar med SGLT2-hämmare i två olika doser, 1,2 mg/kg och 1,8 mg/kg kanagliflozin (Ivokana 300 mg). Ett standardiserat OGT, oralt glukostest, körs innan påbörjad medicinering samt efter 24 dagars medicinering. Hästarnas blodglukos och plasmainsulin följs. Hur påverkas blodglukos och plasmainsulin hos EMS-sjuka hästar vid de två olika doseringarna av SGLT2-hämmare?

2. Litteraturöversikt

2.1. Ekvint metabolt syndrom

Ekvint metabolt syndrom, EMS, är ett sjukdomskomplex hos häst som inkluderar onormal fettmetabolism, insulinresistens och fång (Durham, *et al.*, 2019). Hästar med EMS karaktäriseras främst utav viktuppgång eller svårighet för viktnedgång trots mindre tillgång på näring än den friska hästen. Dessa individer kan utveckla fettdepåer tydligast över mankammen men även på flera ställen över kroppen eller ha en mer generell fettansättning (McCue, *et al.*, 2015). Ofta har de haft subklinisk fång med diffusa håltor på ett eller flera ben, eller blivit diagnostiserade och behandlade för klinisk fång en gång eller vid flertalet tillfällen (Frank, *et al.*, 2010).

EMS är för hästen en livslång diagnos och för hästägaren en daglig oro för att hästen utvecklar fång. Idag kontrolleras sjukdomen främst med foderåtgärder men tyvärr är detta ofta ej tillräckligt för de individer som har mycket kraftigt störd insulinreglering och många får avlivas då fången ej går att behandla.

2.1.1. Ökad fettmassa – lokal eller generell

Hästar med EMS behöver inte nödvändigtvis vara överviktiga eller ha karaktäristiska fettdepåer, som ofta är förknippade med EMS, de kan även ha en mer generell förfettnings av vävnaden. Man har sett att vissa raser som exempelvis shetlandsponny, welsh ponnys, islandshästar, och morganhästar är överrepresenterade när det kommer till övervikt (Durham, *et al.*, 2019). Hos Welsh ponnyn och morganhästen har man kunnat visa på ett genetiskt samband (Norton, *et al.*, 2019). Det kan finnas en förklaring i att dessa typer av hästar och ponnys är evolutionärt anpassade till miljöer med dålig tillgång på foder varpå deras metabolism blivit mycket effektiv och de kan överleva på foder med dåliga näringsvärden. Miljön spelar därav en mycket stor roll i huruvida individen är överviktig eller ej. Överutfodring och för lite motion leder till ökad fettmassa, antingen lokal eller generell. Ökad mängd fettväv har visat sig minska känsligheten för insulin och insulinresistens uppstår (Frank, *et al.*, 2010).

2.1.2. Insulinresistens, IR,

Insulin produceras i pankreas beta-celler. Frisättning av insulin i blodet stimuleras främst utav blodglukos men även till viss del fria aminosyror. Insulin binder i vanliga fall in till insulinreceptorer på cellmembran och aktiverar tyrosinkinas. Effekten i cellen blir ökat glukosupptag, ökad glykogensyntes och minskad glukoneogenes, ökad syntes av triglycerider, minskad lipolys, ökat upptag av aminosyror och ökad proteinsyntes. Generellt kan man säga att insulin bygger upp energireserver (Sjaastad, *et al.*, 2010).

Vid insulinresistens är det insulinreceptorerna eller den efterföljande intracellulära signalkaskaden som inte svarar normalt på insulin, och effekten insulin har i cellen minskar. Resultatet blir att nivåerna av blodglukos stiger, vilket ytterligare stimulerar betaceller att producera och frisätta insulin, varpå vi ser förhöjda nivåer av insulin i blodet.

2.1.3. Fång

Fång är en inflammation i hovens stödjevävnad. Hästar kan utveckla fång av olika anledningar, exempelvis foderbyte till högkvalitativt gräs (Luthersson, *et al.*, 2017), kvarvarande efterbörd och kolik (Parsons, *et al.*, 2007). Hästar med EMS utvecklar dock fång sekundärt till postprandiell hyperinsulinemi (Meier, *et al.*, 2018).

Den bakomliggande mekanismen till varför hästar med EMS är predisponerade att utveckla fång är mycket komplex och inte helt klarlagt, men man har sett en tydlig koppling mellan kraftigt förhöjda insulinnivåer i blodet och fång i både försöksmodeller (Meier, *et al.*, 2018) (Asplin, *et al.*, 2007) och vid naturligt förekommande fång (Karikoski, *et al.*, 2011). Olika teorier finns kring patofysiologin.

En teori beaktar insulinberoende celltyper och inflammation i hovens stödjevävnad. Vid insulinresistens drabbas insulinberoende celltyper av glukosbrist. Hovarnas cirkulation är redan nedsatt hos friska individer, och därigenom tillgången på glukos. Vid ytterligare minskat glukosupptag hos endotelceller i hovens kapillärer, då insulinreceptorerna inte svarar normalt på insulin, ses endotelskador som följd. Höga insulinnivåer stimulerar immunförsvaret och en inflammatorisk process kring det skadade endotelet aktiveras (Treiber, *et al.*, 2006).

Endotelskador och en efterföljande inflammation är dock enbart en liten del av den bakomliggande förklaringen till utvecklandet av fång vid hyperinsulinemi. Insulin-like growth factor-1 receptorn (IGF-1), som finns till stor del i det laminära epitelet i hovkapseln, har visat sig aktiveras av höga insulinnivåer samt kostrelaterade kolhydratsförändringar. Aktiveringen av IGF-1 och den efterföljande intracellulära kaskaden leder till en onormal utveckling av cytoskelettet och därigenom utsträckta laminära epitelceller, och utvecklandet av fång (Lane, *et al.*, 2017).

2.2. Glukosreglering i njuren

Det är inte enbart insulin som reglerar kroppens blodglukos utan även njurarna spelar en viktig roll när det kommer till regleringen av kroppens blodglukosnivåer. I njuren sker glukoneogenes, filtration av glukos, resorption av glukos samt förbrukning av glukos. Glukos filtreras i glomeruli för att sedan resorberas i proximala tubuli (S1 och S3) medierat av natrium-glukos co-transportörer typ 1 och 2 (SGLT1 och SGLT2) (Chao & Henry, 2010). SGLT2 finns i S1 segmentet av tubuli och har en låg affinitet och hög kapacitet, och står för ca 90 % av resorptionen glukos. SGLT1 återfinns i S3 segmentet av tubuli och har en hög affinitet och låg kapacitet, och står för resterande 10 % av resorptionen glukos (Mather & Pollock, 2011).

2.2.1. SGLT2-hämmare inom humanmedicin

SGLT2-hämmare är en relativt ny grupp av läkemedel som främst används för att behandla typ 2 Diabetes Mellitus hos människor. Genom att blockera SGLT2 och därigenom orsaka glukosuri har det visat sig att man inte bara sänker blodglukoskoncentrationen efter måltider utan även blodglukosnivåerna efter fasta. Njurens tröskelvärde för glukosuri sänks och fluktuationer i blodglukos minimeras (Thomas & Cherney, 2018).

Effekten av att sänka nivåerna blodglukos blir indirekt sänkta insulinnivåer i blodet då blodglukosens stimulering på betacellerna är koncentrationsberoende. Lägre blodglukoskoncentrationer ger således lägre insulinfrisättning. Man får även förlust av natrium som verkar som en del av en blodtryckssänkande effekt samt förlust av glukos, som kompenseras av metabolisering av fettsyror och därigenom en vikt-förlust i form av ren förlust av fett. Den totala biologiska effekten och mekanismen är ännu ej helt klarlagd men hos människa ses minskade nivåer blodglukos både efter födointag och fasta, viktminskning, och sänkt blodtryck (Haas, *et al.*, 2014).

3. Material och metod

I studien deltog fem privathästar som i fält av annan praktiserande veterinär diagnostiserats med EMS genom konfirmerande av insulinresistens genom oralt glukos test (OGT) alternativt fasteinsulin (F-insulin) med insulin peak enligt tabell (Tabell 1). Hästägarna har själva anmält intresse att delta i studien. Hästägarna har tagit del utav studiens upplägg och syfte och skrivit under ett djurägarmedgivande (Bilaga 1). Samtliga hästar har transporterats till och från Hästkliniken vid SLU i Uppsala utav hästägaren.

Tabell 1. Samtliga deltagande hästar i studien med tilldelad bokstav, diagnostiseringsmetod i fält med insulin peak (mU/L), kön ras och ålder (år).

Bokstav	Häst	Prov i fält	Ins peak (mU/L)	Kön	Ras	Ålder (år)
A	Spirit	OGT	130,0	Valack	Shetland	8
B	Juicy	OGT	>173	Sto	Russ	8
C	Diva	F-insulin	>173	Sto	Island	15
D	Snutten	OGT	340,0	Valack	Shetland	9
E	Blenda	F-insulin	>173	Sto	Connemara	16

3.1. Uppstallning och miljö

Hästarna stallades upp i ett separat stall på Hästkliniken vid SLU i Uppsala. Häst A stallades upp ensam under båda besöken. Häst B och C samt D och E stallades upp tillsammans under försöksperioderna.

Boxarna var av standardstorlek och strömaterial utav kutterspån. Hästarna hade fri tillgång på vatten i hink antingen upphängt på boxvägg eller ståendes på golvet

beroende på storlek utav häst. Hästarna hade daglig utevistelse i grusad hage med tillgång på vatten i hink efter den dagens avslutade försök.

Utfodring skedde med hästens eget grovfoder, som hästägaren lämnat tillsammans med hästen. Utfodring utfördes klockan 7.00, 12.00, 16.00 samt 22.00 förutom då försöken utfördes. Grovfodergivan har vägts upp i påsar markerade med hästens namn och tidpunkt för utfodring. Vid utebliven fodergiva, p.g.a. försöken, har denna delats upp på de resterande utfodringarna den dagen, så den totala mängden foder per dygn ej varierat. Ett utfodringsschema har funnits på vardera hästs box-dörr där noteringar om eventuell svält eller utfodring tydligt varit markerad.

3.2. Försöksperiodens upplägg

Varje häst har totalt deltagit i studien i 28 dagar. Dag 1 har hästen ankommit till Hästkliniken vid SLU i Uppsala. Under dag 2 genomfördes en allmänklinisk undersökning och hästen vägdes. Samma digitala våg har använts vid alla tillfällen. Hästen rakades över jugularfåran på båda sidor av halsen. En permanentkanyl i ena jugularen sattes efter att området lokalbedövats med Emla-kräm (lidokain 25 mg/g, prilokain 25 mg/g, Aspen Nordic) i 30 minuter samt steriltvättats med klorhexidinschampoo och M-sprit. Kanylen suturerades fast till huden. Denna kanyl användes under samtliga försök vid blodprovstagning. Fortsättningsvis spolades kanylen med fysiologisk koksaltlösning vid varje utfodringstillfälle.

Dag 3-5 utfördes försöken som beskrivs nedan. Under dag 4 sattes en andra permanentkanyl på motsvarande sida som den första enligt beskrivningen ovan. Denna kanyl användes som infart under försökets dag 5. Efter dag 5 avlägsnades båda permanentkanylerna och jugularerna kontrollerades. Innan försöken påbörjades samtliga dagar togs hästarnas blodtryck. Detta skedde direkt på morgonen under lugna och tysta förhållanden.

Dag 5 åkte samtliga hästar hem till eget stall och kom sedan åter dag 25. Under perioden dag 5-25 återgick hästarna till sina normala rutiner. Utfodringsrutinerna samt mängden foder och fodermedel hölls konstanta under försöksperiodens hela längd och motsvarades av den foderstat som hästarna stått på de senaste tre veckorna innan försöket.

Från och med dag 5 påbörjades behandling med Invokana, 300 mg kanagliflozin (SLGT2-hämmare), i form av tabletter. Tabletterna gavs i en äppelklyfta klockan 21.00 varje dag och hästägaren kontrollerade att tabletten ej spottades ut. Två av hästarna (B och D) behandlades med kanagliflozin 1,8 mg/kg q24h, och tre av hästarna (A, C och E) behandlades med kanagliflozin 1,2 mg/kg q24h. Vilken häst som

har behandlats med vilken dos har lottats in och dessutom varit okänt för de som undersökt hästarna under försökets gång.

Dag 25-28 utfördes lika som dag 1-4 med ända skillnaden att hästarna stod på fortsatt medicinering med kanagliflozin klockan 21.00 dagligen.

3.2.1. Oralt glukostest, OGT dag 2 och 26

Försöket går ut på att fasta över natten ge en glukoslösning (Dan Sukker glukossirap, Nordic Sugar AB), oralt för att sedan följa blodglukos och plasmainsulin genom upprepade blodprovstagningar. Försöken började klockan 07.00 och senaste utfodring var klockan 22.00 dagen innan. Försöken utfördes i hästens box där den hade fri tillgång till vatten i hink.

Dagen började med att blodtryck togs under lugna och tysta förhållanden runt klockan 06.15. En trevägsförlängning (Discofix, Braun) kopplades till permanentkanylen och fästes med färgad tape kring hästens hals. Permanentkanylen spolades med fysiologisk koksaltlösning. Hästarna vägdes på digitalvåg. Ett blodprov (nollprov), togs 10 minuter innan den orala glukosgivan.

Standarddos av Dan Sukker glukossirap, 0,5 ml/kg, användes. Den totala mängden glukossirap baserades på dagens aktuella vikt (Tabell 2). Förpackningen med glukossirap låg 20 minuter i ett ljummet vattenbad för att bli mer lättflytande innan den drogs upp i orala sprutor. Glukossirapen gavs oralt genom att sprutan fördes in i mungipan och glukossirapen långsamt deponerades. När hela dosen glukossirap givits startades ett individuellt tidtagarur. Hästens mun torkades med fuktigt papper.

Tabell 2. Glukosgiva vid de två olika OGT i milliliter med dosering på 0,5 ml/kg och baserat på hästens vikt i kilogram den aktuella dagen.

Häst	OGT 1		OGT 2	
	Vikt (kg)	Glukosgiva (ml)	Vikt (kg)	Glukosgiva (ml)
A	260,0	130	251,0	125,5
B	342,0	171	328,0	164
C	437,5	219	410,5	205,25
D	165,0	83	157,0	78,5
E	445,5	223	424,0	212

Blodprov togs genom att 10 sekunder innan provtagning dra 5 ml blod ur kanylen, som sedan slängdes. Därefter drogs 20 ml blod ur kanylen, och kanylen spolades med 10 ml fysiologisk koksaltlösning. Provtagning utfördes 10 minuter innan oral glukosgiva, samt vid 15, 30, 60, 90, 120, 150 och 180 minuter efter oral glukosgiva.

Blodglukos mättes direkt i helblod efter blodprovstagning med hjälp av en portabel glukometer (Accu-Check Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sweden). Samma glukometer har använts till samma häst vid samtliga provtagningar och tillfällen. Resterande blod i sprutan delades upp i ett vardera litium-heparin-, EDTA- och serumrör. Hästarna har under provtagningen varit uppbundna i boxen. Mellan provtagningarna har de kunnat röra sig fritt i boxen.

Vid försökets avslut kopplades trevägsförlängningen och tillhörande tape bort. Kanylen fick en kork med membran och spolades med fysiologisk koksaltlösning. Hästarna tillbringade resten av dagen i grusad rasthage vid uppehåll av regn, för att säkerställa hygien av permanentkanylen. Den missade morgonfodergivan delades upp på resterande mål och utfodrades enligt schema.

Resultaten av denna studie är baserade på det orala glukostestet. Nedan följer en kort beskrivning av resterande tester under försöksperioden.

3.2.2. Meal toleranse test, MTT, dag 3 och 27

Meal toleranse test, MTT, är ett fodertoleranstest där blodglukos och plasmainsulin följs över tid. Hästen utfodrades med sitt eget grovfoder klockan 07.00 med en standardgiva om 0,4 kg ts/kg kroppsvikt. Hästens grovfoder skickades på analys för innehåll av socker och fruktaner. Ättiden noterades i protokoll och i de fall där hästen inte åt upp hela fodergivan vid första MTT korrigerades detta till andra omgångens MTT.

Provtagning skedde vid tiderna -10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, och 300 minuter enligt samma princip som vid OGT.

Innan MTT vid båda omgångar togs blodprov i serumrör för analys av GLDH, GGT, triglycerider, protein, natrium, kalium och klorid.

3.2.3. Graderad glukosinfusion, GGI, dag 4 och 28

Vid detta försök hade hästen två permanentkanyler, en i vardera jugularven. I ena kanylen gavs en 20 % glukosinfusion i sex 40 minuters steg. Provtagning utfördes

i den andra kanylen 10 minuter innan testet startade och därefter var tionde minut upp till 240 minuter. Blodglukos och plasmainsulin följdes.

3.3. Blodprovshantering och analys av prover

Blodprovstagning skedde vid samtliga provtagningar i ordningen:

- -10 sekunder, 5 ml blod drogs från permanentkanylen och slängdes.
- Provtagning skedde genom att 10 ml eller 20 ml blod drogs från permanentkanylen vid exakt angiven tidpunkt enligt protokollet.
- Permanentkanyl spolades med 10 ml fysiologisk koksaltlösning.

En droppe blod från provsprutan doppades på Accu check- sticks på en portabel glukometer (Accu-Check Aviva, Roche Diagnostics Scandinavia AB, Bromma, Sweden). Glukoskoncentrationen lästes av och noteras i protokollet. En steril rosa kanyl kopplas till sprutan och resterande blod delades upp i blodprovsrör av typen Litium-Heparin (4 ml), EDTA (4 ml), och Serum (10 ml) enligt protokollet.

Litium-Heparin- och EDTA-rör placeras omgående i centrifug och centrifugeras i 10 minuter på 4500 varv per minut. Serumrör placeras i provställ och centrifugeras först en timme efter taget prov.

Plasma, alternativt serum, pipetterades sedan över i eppendorfrör (aliquouter) markerade med rörtyp, häst och prov samt försökstyp och omgång. Exempelvis Li-H, D5, O2 vilket står för Litium-Heparin, häst D prov 5, OGT omgång 2. Rören märktes på både lock och sida. Direkt efter att plasman/serum uppdelats i korrekt antal aliquouter placerades dessa i frysbox i -80°C.

Efter att samtliga prover från alla provomgångar är insamlade lämnas dessa över frysta till Kliniska kemiska laboriet vid SLU i Uppsala för analys av utvald blodkemi, analyserad på serum (GLDH, GGT, triglycerider, protein, natrium, kalium och klorider). Plasmainsulin analyserades i duplikat vid kliniska vetenskapers metabola laboratorium. Plasmainsulinnivåerna från samtliga blodprovstagningar bestämdes via en häst-optimerad ELISA (Mercodia Equine Insulin ELISA, Mercodia AB, Uppsala, Sverige).

3.4. Statistik och beräkningar

Samtliga statistiska analyser och resultatberäkningar baserades på de insamlade data vid OGT 1 och OGT 2. Data bearbetades till grafer och arean under kurvan (AUC), för glukos (AUC_{Glukos}) och insulin ($AUC_{Insulin}$) räknades ut i GraphPad Prism 9 med hjälp av trapetzformel.

Värden för blodglukos och plasmainsulin vid fasta redovisas. Fluktuationen, skillnaden mellan högsta och lägsta uppmätta värde av blodglukos och plasmainsulin över 190 minuter vid båda tillfällen OGT redovisas, samt representerar hur pass stabilt blodglukos och plasmainsulin förhåller sig under behandling med kanagliflozin jämfört med innan behandling.

4. Resultat

4.1. Vikt

Samtliga hästar som deltog i studien har minskat i vikt (Tabell 3). Största förändring sågs hos häst C som minskade med totalt 6,2 % av sin ursprungsvikt beräknat mellan de två OGT-omgångarna, med en medelförlust på 1,13 kg/dygn över 24 dagars tid. Minst förändring sågs hos häst A med en minskning av 3,5 % av ursprungsvikten med en medelförlust på 0,38 kg/dygn över 24 dagars tid.

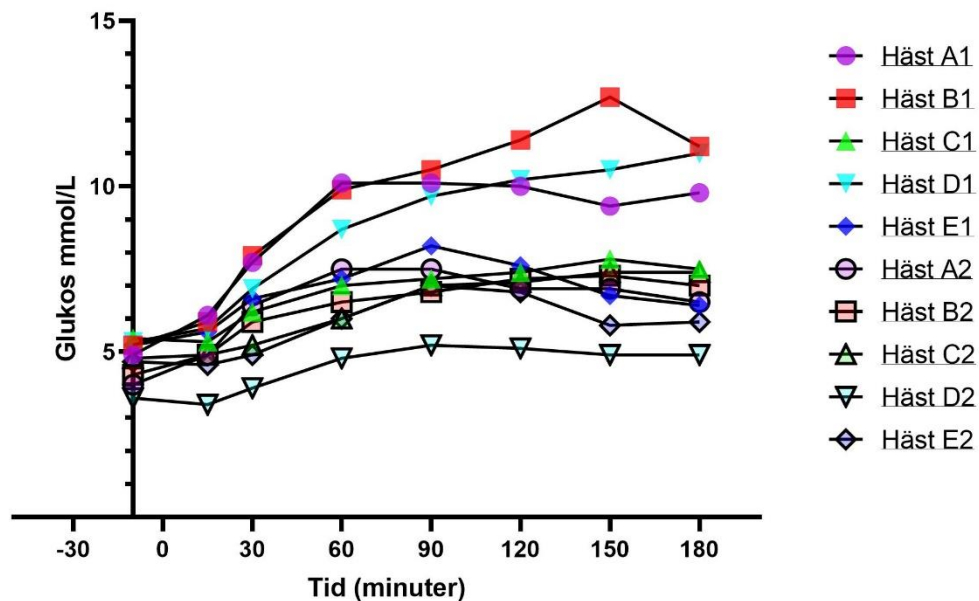
Tabell 3. Hästarnas vikt registrerat vid OGT dag 2 och 26 med total viktninskning i kilogram och procent, samt minskning i kilogram per dygn mellan de två tillfällena.

Häst	Vikt		Viktninskning		
	Dag 2 (kg)	Dag 26 (kg)	Total (kg)	Kg/Dygn	Procent (%)
A	260,0	251,0	-9,0	0,38	3,5
B	342,0	328,0	-14,0	0,58	4,1
C	437,5	410,5	-27,0	1,13	6,2
D	165,0	157,0	-8,5	0,35	4,8
E	445,5	424,0	-21,5	0,90	4,8

4.2. Blodglukos

Vid mätning av blodglukos sågs en markant skillnad mellan OGT omgångarna, d.v.s. före och under behandling med kanagliflozin. Samtliga hästar har efter behandling ett lägre blodglukosvärde vid fasta och planare blodglukoskurvor efter

oral giva glukos över tid. Störst skillnad på blodglukoskurvorna ses hos häst A, B och D, där en markant utplaning av kurvorna ses.



Figur 1. Individuella glukoskoncentrationer (mmol/L) för hästarna A – E under ett oralt glukostest (OGT) utfört före och under behandling med kanagliflozin. A1 – E1 visar hästarnas glukoskoncentrationer före behandling med kanagliflozin. A2 – E2 visa hästarnas glukoskoncentrationer under behandling med kanagliflozin och efter total behandlingstid på 24 dagar q24h.

Enligt tabell 3 sågs att värdet för arean under kurvan (AUC_{Glukos}) har minskat med 48,2 % mellan OGT omgångarna hos häst D. Häst A och B ligger runt en minskning med 30 %, häst E ca 15 %. Minst förändring ses hos häst C med ca 7 % minskning av AUC vid mätning av blodglukos.

Häst B och D som behandlades med 1,8 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av AUC_{Glukos} på 41,5 %. Häst A, C och E som behandlades med 1,2 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av AUC_{Glukos} på 16,1 %.

Tabell 4. Arean under kurvan (AUC_{Glukos}) för blodglukos (mmol/L x min) vid OGT 1 innan behandling, och OGT 2 under behandling med kanagliflozin, samt sammanställning av minskning i procent (%).

Häst	AUC_{Glukos} OGT 1	AUC_{Glukos} OGT 2	Minskning i procent (%)
A	1637	1209	26,1
B	1808	1178	34,8
C	1254	1163	7,3
D	1619	838,3	48,2
E	1259	1071	14,9

Fasteglukos minskade hos samtliga hästar efter behandling med kanagliflozin (Tabell 5), störst minskning ses hos häst D med en minskning på dryga 30 %. Häst B och D som behandlades med 1,8 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av blodglukos efter fasta på 24,7 %. Häst A, C och E som behandlades med 1,2 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av blodglukos efter fasta på 13,0 %.

Skillnaden i medelfluktuations blodglukos hos häst B och D sjönk från 6,6 mmol/L till 2,4 mmol/L. Hos häst A, C och E sjönk medelfluktuations blodglukos från 3,6 mmol/L till 2,8 mmol/L (Tabell 5).

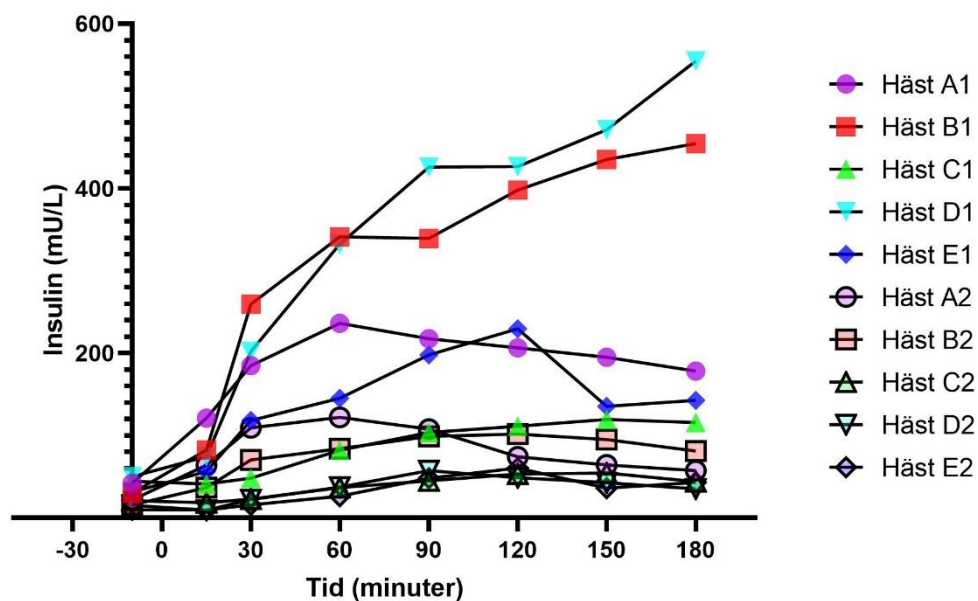
Tabell 5. Skillnad i blodglukoskoncentrationen i mmol/L vid fasta innan (OGT 1) och under behandling (OGT 2) med kanagliflozin, samt minskning av blodglukoskoncentrationen i procent (%). Fluktuation blodglukos (mmol/L) mellan högsta och lägsta mätning av blodglukos efter oral glukosgiva under 190 minuter.

Häst	OGT 1	OGT 2	Minskning(%)	Fluktuation OGT 1	Fluktuation OGT 2
A	4,9	4,0	18,4	5,2	3,5
B	5,2	4,3	17,3	7,5	3,0
C	5,4	4,8	11,1	2,5	2,6
D	5,3	3,6	32,1	5,7	1,8
E	5,2	4,7	9,6	3,0	2,4

4.3. Plasmainsulin

Plasmainsulinkoncentrationerna i blodet har minskat hos samtliga av hästarna efter behandling (Figur 2). Häst D som innan behandling fick högsta uppmätta värde av plasmainsulin på 554,8 mU/L har efter behandling högsta värde på 57,4 mU/L, vilket motsvarar en minskning med ca 90 %.

Största skillnaden mellan högsta och lägsta plasmainsulinvärde efter behandling ses hos häst A med en skillnad av 100,3 mU/L, då högsta värde registrerats efter 60 minuter.



Figur 2. Individuella plasmainsulinkoncentrationer (mU/L) för hästarna A – E under ett oralt glukostest (OGT) utfört före och under behandling med kanagliflozin. A1 – E1 visar hästarnas insulinkoncentrationer före behandling med kanagliflozin. A2 – E2 visar hästarnas insulinkoncentrationer under behandling med kanagliflozin och efter total behandlingstid på 24 dagar q24h.

Arean under kurvan har hos samtliga hästar minskat med minst 50 %. Störst förändring ses hos häst D där AUC minskat med 89,3 % (Tabell 6).

Häst B och D som behandlades med 1,8 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av $AUC_{Insulin}$ på 82,2 %. Häst A, C och E som behandlades med 1,2 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av $AUC_{Insulin}$ på 62,4 %.

Tabell 6. Arean under kurvan ($AUC_{Insulin}$) för plasmainsulin ($mU/L \times min$) vid OGT 1 innan behandling, och OGT 2 under behandling med kanagliflozin, samt sammanställning av minskning i procent (%).

Häst	$AUC_{Insulin}$ OGT 1	$AUC_{Insulin}$ OGT 2	Minskning i procent (%)
A	34616	15487	55,3
B	59519	14855	75,0
C	16251	7268	55,3
D	64041	6866	89,3
E	27110	6338	76,6

Plasmainsulin minskade hos samtliga hästar efter behandling med kanagliflozin (Tabell 7), störst minskning ses hos häst D och E med en minskning runt 70 %. Häst B och D som behandlades med 1,8 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av plasmainsulin efter fasta på 58,6 %. Häst A, C och E som behandlades med 1,2 mg/kg kanagliflozin fick en medelminskning av plasmainsulin efter fasta på 56,8 %.

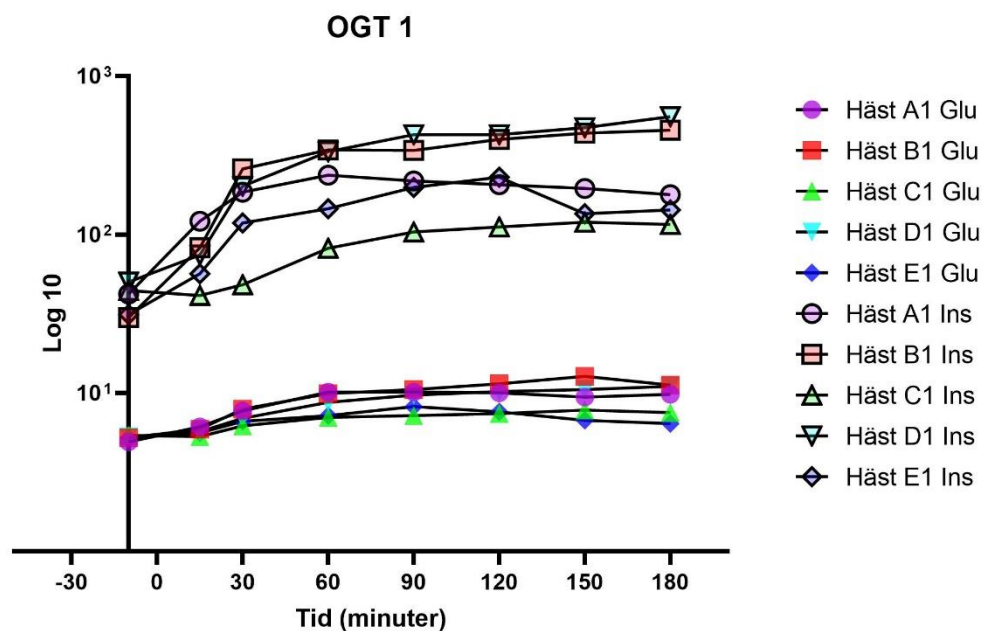
Skillnaden i medelfluktuationsplasmainsulin hos häst B och D sjönk från 464,7 mU/L till 66,9 mU/L. Hos häst A, C och E sjönk medelfluktuationsplasmainsulin från 156,9 mU/L till 62,4 mU/L.

Tabell 7. Skillnad i plasmainsulin i mU/L vid fasta innan (OGT 1) och efter behandling (OGT 2) med kanagliflozin, samt minskning av plasmainsulin vid fasta i procent (%). Fluktuation plasmainsulin (mU/L) mellan högsta och lägsta mätning av seruminsulin efter oral glukosgiva under 190 minuter.

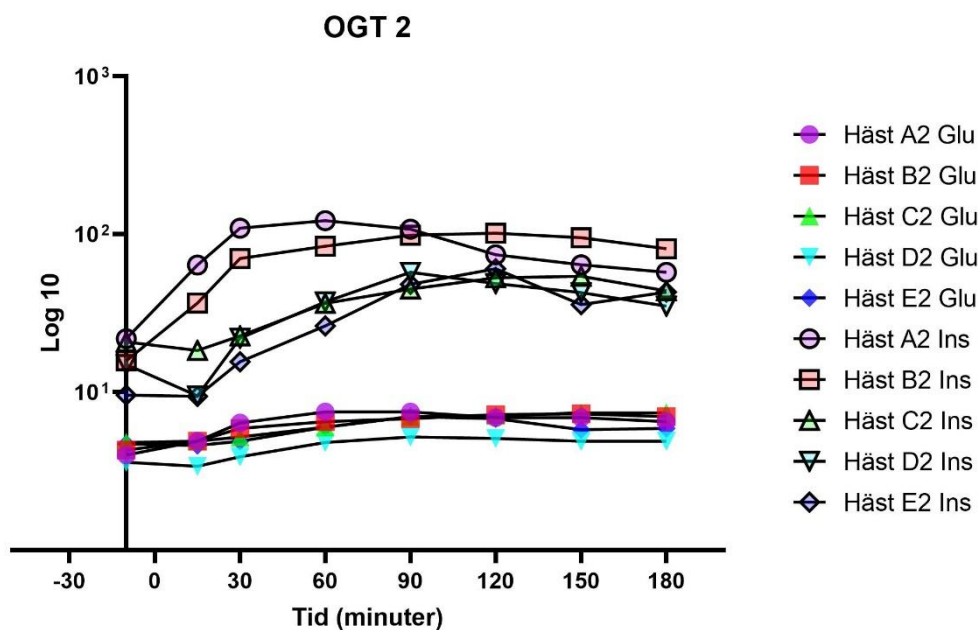
Häst	OGT 1	OGT 2	Minskning(%)	Fluktuation OGT 1	Fluktuation OGT 2
A	42,1	21,8	48,2	194,1	100,3
B	29,9	15,8	47,2	424,6	85,8
C	44,3	20,8	53,0	78,3	35,9
D	50,0	15,0	70,0	504,8	47,9
E	31,2	9,6	69,2	198,4	51,1

Vid jämförelse av ett logaritmiskt förhållande mellan blodglukos och plasmainsulin under OGT 1 och OGT 2 ses att samtliga kurvor vid OGT 1 ej planat ut för att återgå till normala nivåer (Figur 3 och Figur 4). Man kan därav anta att de högsta värden på både blodglukos och seruminsulin ej finns med i mätningarna vid 180 minuter.

Vid OGT 2 registreras högsta värden för blodglukos och plasmainsulin upp till 120 minuter för att sedan plana ut och sjunka. Man har därav fått med högsta glukostopp och följande insulintopp under mätningarna på 180 minuter (Figur 3 och Figur 4).



Figur 3. Logaritmiskt förhållande mellan blodglukos och plasmainsulin vid OGT 1 innan behandling där A1 Glu – E1 Glu motsvarar häst A – E blodglukoskoncentrationer (mmol/L) vid OGT 1 innan behandling med kanagliflozin och A1 Ins – E1 Ins motsvarar häst A – E plasmainsulinkoncentrationer (mU/L) vid OGT 1 innan behandling med kanagliflozin.



Figur 4. Logaritmiskt förhållande mellan blodglukos och seruminsulin vid OGT 2 under behandling där A2 Glu – E2 Glu motsvarar häst A – E blodglukoskoncentrationer (mmol/L) vid OGT 2 under behandling med kanagliflozin och A2 Ins – E2 Ins motsvarar häst A – E plasmainsulinkoncentrationer (mU/L) vid OGT 2 under behandling med kanagliflozin.

4.4. Övriga resultat och analyser

Hos samtliga hästar ses en ökning i GLDH (Tabell 8) under behandlingen med kanagliflozin. Hos häst A och D ses ett förhöjt värde av GLDH redan innan behandlingen. Under behandlingen med kanagliflozin ses en måttlig till kraftig förhöjning av GLDH hos häst A och D. Häst D har behandlats med 1,8 mg/kg kanagliflozin. Hos häst B, som också behandlades med 1,8 mg/kg kanagliflozin, ses normala GLDH-värden innan behandling. Häst C och E, som behandlades med 1,2 mg/kg kanagliflozin, har normala GLDH-värden både innan och under behandlingen.

Även triglycerider ökade hos samtliga hästar. Under behandlingen med kanagliflozin uppmättes nivåer av triglycerider över referensvärde (0,1-0,5 mmol/L) oavsett vilken dos hästen behandlades med. Häst A hade kraftigt förhöjda nivåer av triglycerider, 14,6 mmol/L, under behandling, vilket var okulärt detekterbart vid blodprovstagningen innan MTT2.

Natriumnivåerna bedöms som oförändrade innan och under behandlingen med kanagliflozin hos samtliga hästar i studien.

Tabell 8. Övrig blodkemi analyserat i samband med MTT 1 innan behandling och MTT 2 under behandling med kanagliflozin, där A1 – E1 motsvarar blodprov taget vid MTT1 och A2 – E2 motsvarar blodprov taget vid MTT2. Analys av GLDH (nkat/L ref. 15-190), GGT (µkat/L ref. 0,1-0,5), triglycerider (mmol/L ref. 0,1-0,5), protein (g/L ref. 56-72), natrium (mmol/L ref.133-145), kalium (mmol/L ref. 2,5-5,0) och klorider (mmol/L ref. 96-106). Siffror markerade i röd text motsvarar värden utanför angivna referensintervall.

	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	E2
GLDH	393	751	67	139	53	120	201	404	51	70
GGT	1,0	1,7	0,4	0,5	0,5	0,4	1,2	1,2	0,3	0,4
TriGly	0,7	14,6	0,6	3,7	0,5	0,7	0,7	3,9	0,4	7,1
Protein	72	77	74	71	76	70	65	66	66	66
Na	138	140	136	136	141	139	139	137	139	136
K	3,2	3,5	3,7	3,8	3,7	3,7	3,7	4,0	3,4	3,7
Cl	101	102	100	98	109	104	101	98	101	97

5. Diskussion

5.1. Viktnedgång

En av effekterna av SGLT2-hämning inom humanmedicin var viktnedgång (Haas, *et al.*, 2014), detta ses även hos hästarna i denna studie. Samtliga hästar har förlorat runt 5 % av sin kroppsvikt oavsett dos av kanagliflozin. Medelprocenten för häst B och D, blir 4,5 %. Motsvarande siffra för häst A, C och E, 4,8 %, där häst C står för större delen av viktnedgångsprocenten med 6,2 % av sin ursprungliga kroppsvikt (Tabell 3).

Då studien enbart är baserad på fem individer går det ej dra säkra slutsatser, men dessa siffror tyder på att det ej finns en dosberoende faktor när det kommer till viktnedgång, den största faktorn är troligen högst individuell. Samtliga hästar hade olika utgångslägen inför studien, dels ras, dels olika grad av övervikt samt lokal eller generell fettansättning. Miljön under tiden försöket pågick i hästarnas eget stall, med återgång till normala rutiner har även det en stor påverkan på hästens viktnedgång. Fodermängden har ej förändrats men utevistelse och motion är ej medtaget i denna studie.

5.2. Blodglukos

Principen med SGLT2-hämning är att sänka blodglukosnivåer både vid fasta och efter måltid genom att sänka njurens tröskelvärde för glukosuri. Målet med behandling är att få stabila glukosnivåer i blodet oavsett intag av föda.

Hos hästarna i studien ses en tydlig minskning av blodglukosnivåer vid fasta. Häst B och D har en genomsnittlig minskning på 24,7 %, jämfört med häst A, C och E med en genomsnittlig minskning på 13,0 %. Fluktuationen minskar från ett genomsnitt på 6,6 till 2,4 hos häst B och D och från 3,6 till 2,8 hos häst A, C och D. Vid den höge dosen kanagliflozin (1,8 mg/kg) fås en större sänkning av blodglukos vid fasta jämfört med den lägre doseringen (1,2 mg/kg) men det ses ingen dosberoende

skillnad i fluktuationer i blodglukos efter oral glukosgiva och mellan grupperna över tid.

Sett till den totala förändringen i blodglukos över 180 minuter efter oral glukosgiva innan och under behandling hos häst B och D är minskningen av AUC_{Glukos} 41,5 %, jämfört med häst C och E med en minskning av AUC_{Glukos} på 16,1 % (Tabell 4). Hos hästar med EMS är dock principen med SGLT2-hämning att indirekt få en lägre insulinfrisättning i beta-cellerna och motverka hyperinsulinemi, genom att sänka blodglukoskoncentrationen.

5.3. Plasmainsulin

Som tidigare visats kan blodglukosnivåerna vid fasta och efter måltid sänkas vid båda doseringar av kanagliflozin samt minska fluktuationer i blodglukos.

Den genomsnittliga minskningen av plasmainsulinnivå vid fasta hos häst B och D är 58,6 % jämfört med häst A, C och E på 56,8 %. Det hade varit förväntat att plasmainsulin skulle följa blodglukoskoncentrationerna men en genomsnittlig minskning av blodglukos, hos häst B och D, på 24,7 % leder till en genomsnittlig minskning av plasmainsulin på 58,6 % vid fasta. Hos häst A, C och E ger en genomsnittlig minskning i blodglukos vid fasta på 13,0 %, en genomsnittlig minskning på 56,8 % plasmainsulin vid fasta. Varför seruminsulin varken följer blodglukos eller verkar dosberoende, är högst oklart. Inom humanmedicin har effekten av SGLT2-hämning på insulinfrisättningen ej studerats. För behandling av EMS sjuka hästar tolkas detta som en positiv egenskap hos SGLT2-hämmarna.

Hur stabila plasmainsulinnivåerna sedan förhåller sig efter oral glukosgiva ses på medelfluktuationen. Hos häst B och D fås en medelfluktuation plasmainsulin innan behandling på 464,7 mU/L jämfört med 66,9 mU/L under behandling. Motsvarande medelvärden för häst A, C och E är 156,9 mU/L innan behandling och 62,4 mU/L under behandling med kanagliflozin. Hos häst B och D sker en minskning i medelfluktuation med 85,6 % jämfört med häst A, C och E på 60,2 %. Mellan grupperna sågs ingen dosberoende skillnad vid medelfluktuation efter behandling.

5.4. Övriga parametrar och analyser

Hos samtliga hästar i studien ses en ökning av leverenzymet GLDH. Hos två av hästarna, häst A och D, sågs leverpåverkan redan innan behandling med kanagliflozin. Dessa två individer visade efter behandlingsperioden måttligt till kraftigt förhöjda GLDH-värden. Häst C, liksom häst D behandlades med 1,8 mg/kg

kanagliflozin, hade normala GLDH-värden innan behandling, och trots förhöjning höll sig värdena inom normalnivåer.

Det ses en ökad belastning på levern hos samtliga hästar i studien. Observandum är att det ses en markant ökning i GLDH under behandling, hos hästar med leverpåverkan redan innan behandling. Detta tyder på en ökad risk för leverskador. Hos samtliga hästar i studien ses även ökade blodkoncentrationer triglycerider. Om det är de ökade blodkoncentrationerna cirkulerande triglycerider som ger den ökade leverpåverkan kan antas, men kräver vidare undersökning.

Natriumnivåerna ses stabila i båda doseringsgrupperna. Förväntat hade varit att natrium sjunkit då SGLT2 i njurarna inte bara resorberar glukos utan även natrium. Hämmning av SGLT2 påverkar således blodnatrium tillräckligt lite då andra fysiologiska funktioner för natriumreglering kan kompensera för förlusten.

5.5. Konklusion

Kanagliflozin har i denna studie stor påverkan på blodglukos och plasmainsulin hos båda doseringsgrupperna (1,2 mg/kg och 1,8 mg/kg kanagliflozin). I tidigare studier (Frank, 2018) där man använt sig av samma dosering kanagliflozin ses inte samma drastiska minskning i insulinnivåer. Skillnaden mellan dessa studier är tidsaspekten, där hästarna i Franks studie provtogs tre dagar efter insättande behandling, i denna studie behandlades hästarna med kanagliflozin i 24 dagar mellan OGT 1 och OGT 2.

Andra studier har undersökt velagliflozin, SGLT2-hämmare framtagen för behandling av diabetessjuka katter (de Laat & Sillence, 2020), till hästar med insulinresistens. I dessa studier sågs att velagliflozin sänkte seruminsulinnivåerna till under tröskelvärde för risk att utveckla fång (Meier, *et al.*, 2019), samt att ingen av behandlade hästar utvecklade fång vid foderbelastning, jämfört med kontroll (Meier, *et al.*, 2018). Intressant är att blodglukosnivåerna ej skilde vid ett kombinerat insulin-glukos tolerans test, vid vecka 0, 16 och 21, mellan obehandlad och behandlad grupp (Meier, *et al.*, 2019). Vid behandling med kanagliflozin ses en tydligare påverkan på blodglukoskoncentrationerna efter OGT. Detta kan bero på att kanagliflozin ej är lika selektiv SGLT2-hämmare som velagliflozin.

Kanagliflozin tycks även hämma SGLT1, som inte bara återfinns i S3 segmentet av tubuli, utan även i tarmepitel där den visat sig vara den främsta intestinala glukos-transportören (Röder, *et al.*, 2014). En hämning av intestinala SGLT1 skulle kunna förklara resultaten där vi i denna studie ser stor viktnedgång samt att plasmainsulin ej tycks följa en dos-respons på individnivå – kanagliflozin tycks inte enbart orsaka glukosförlust via njuren utan även hämma glukosupptag i tarmen.

Velagliflozin har vidare bedömts som en säker behandling som tolererats väl under en längre behandlingsperiod, 21 veckor, och utan ökad risk för återfall vid utsättande av behandling (Meier, *et al.*, 2019). Baserat på denna studie ses en ökad risk för leverskador redan efter 3 veckors behandling med kanagliflozin, främst hos hästar med leverpåverkan redan innan påbörjad behandling, vilket kräver vidare undersökning.

Invokana 30 tabletter, 300 mg kanagliflozin, kostar idag runt 570 kr. För en häst på 500 kg och en dos på 1,2 mg/kg q24h motsvarar detta 2 tabletter dagligen till en kostnad på 1140 kr/månad. Den högre dosen på 1,8 mg/kg q24h till 500 kg häst, motsvarar 3 tabletter dagligen till en kostnad på 1710 kr/månad. Jämförs detta med Prascend, pergolid 1 mg, en vanlig behandling vid PPID hos häst, där normaldosering till 500 kg häst kostar runt 500 kr/månad, bedöms behandlingen med kanagliflozin som dyr, men ej oöverkomlig.

5.6. Slutsats

SGLT2-hämning leder till viktnedgång hos häst, i denna studie går det dock ej uträna om viktnedgången är dosberoende eller ej då flertalet individuella faktorer samt miljöfaktorer så som träning i hemmamiljö ej är inkluderat i studien. Kanagliflozin tycks även hämma glukosupptaget i tarmen vilket leder till ytterligare vikt-nedgång.

En högre dos kanagliflozin ger en större sänkning av blodglukos vid fasta. När fluktuationer i blodglukos efter födointag jämförs mellan grupperna ses ingen dosberoende skillnad, båda doser i denna studie leder till en medelfluktuation på 2,7 mmol/L jämfört med medelfluktuation innan behandling på 4,8 mmol/L.

Sänkning av plasmainsulinnivåer i blodet följer inte blodglukos eller verkar dosberoende efter behandling med kanagliflozin. En medelsänkning av blodglukos på 17,7 % leder till en medelsänkning av plasmainsulin på 57,5 % för samtliga hästar i studien. SGLT2-hämmare påverkar även insulinfrisättning med okänd mekanism, detta kan bero på att kanagliflozin ej är selektiv SGLT2-hämmare utan även hämmar SGLT1 i tarmepitel och därigenom glukosupptaget i tarmen.

SGLT2-hämmare har en framtid inom behandlingsstrategin för EMS hästar. Vi ser en vikt-nedgång hos tidigare svårantade hästar. Tröskelvärde i njuren för glukosuri sänks vilket medför lägre blodglukos vid fasta och stabilare glukosnivåer efter födointag. Kanagliflozin tycks även hämma SGLT1 i tarmen och därigenom glukosupptaget vilket tycks sänka nivåerna plasmainsulin ytterligare vilket är den huvudsakliga faktorn vid behandling av EMS sjuka hästar och motverkandet hyperinsulinemi och därigenom fång.

Då en ökad påfrestning på levern ses hos samtliga hästar i studien bör kanagliflozin ej ges till hästar med tecken på leverskada, så som ökade nivåer GLDH. Levervärdet och leverfunktion bör kontrolleras regelbundet innan och under behandling för att minska risken för negativ leverpåverkan. Vilken typ av leverpåverkan SGLT2-hämmare har hos häst, om det är en biverkan av medicinen eller den ökade fettmetabolismen, bör undersökas vidare för att kunna göra en adekvat risk-nyttabedömning med behandlingen.

Denna studie är begränsad till fem individer med olika individuella förutsättningar. För att kunna dra säkrare slutsatser krävs studier av en större population, samt över längre tid. Ska hästar med EMS behandlas med kanagliflozin/SGLT2-hämmare är det högst troligt en livslång behandling. I dagens läge vet vi ej hur denna läkemedelsgrupp påverkar hästarna över lång tid, eller vilka möjliga biverkningar som kan komma att uppdagas.

Referenser

- Asplin, K. E., Sillence, M. N., Pollitt, C. C. & McGowan, C. M. (2007). Induction of laminitis by prolonged hyperinsulinaemia in clinically normal ponies. *The Veterinary Journal*, 174(3), pp. 530-535.
- Chao, E. C. & Henry, R. R. (2010). SGLT2-inhibition - novel strategy for diabetes treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, pp. 551-559.
- de Laat, M. A. & Sillence, M. N. (2020). A review of recent developments in the pharmacological prevention and treatment of endocrinopathic laminitis. *Animal Production Science*, 60(18), pp. 2111-2121.
- Durham, A. E., Frank, N., McGowan, C. M., Menzies-Gow, N. J., Roelfsema, E., Vervuert, I., Feige, K. & Fey, K. (2019). ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Internal Veterinary Medicine*, 33(2), pp. 335-349.
- Frank, N. (2018). Safety and efficacy of canagliflozin and octreotide for managing insulin dysregulation in horses. *Journal of Veterinary Medicine*, 32, pp. 2123-2143.
- Frank, N., Geor, R. J., Bailey, S. R., Durham, A. E. & Johnson, P. J. (2010). Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3), pp. 467-475.
- Haas, B., N. Eckstein, V. P., Mayer, P. & Hass, M. D. S. (2014). Efficacy, safety and regulatory status of SGLT2 inhibitors: focus on canagliflozin. *Nutrition & Diabetes*, 4(143).
- Karikoski, N. P., Horn, I., McGowan, T. W. & McGowan, C. M. (2011). The prevalence of endocrinopathic laminitis among horses presented for laminitis at a first-opinion/referral equine hospital. *Domestic Animal Endocrinology*, 41(3), pp. 111-117.
- Lane, H. E., Burns, T. A., Hegedus, O. C., Watts, M. R., Weber, P. S., Woltman, K. A., Geor, R. J., McCutcheon, L. J., Eades, S. C., Mathes, L. E., Belknap, J. K. (2017). Lamellar events related to insulin-like growth factor-1 receptor signalling in two models relevant to endocrinopathic laminitis. *Equine Veterinary Journal*, 49(5), pp. 643-654.
- Luthersson, N., Mannfalk, M., Parkin, T. D. H. & Harris, P. (2017). Laminitis: risk factors and outcome in a group of Danish horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, Volym 53, pp. 68-73.
- Mather, A. & Pollock, C. (2011). Glucose handling by the kidney. *Kidney International*, 79(120), pp. S1-S6.

- McCue, M. E., Geor, R. J. & Schultz, N. (2015). Equine metabolic syndrome: a complex disease influenced by genetics and the environment. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(5), pp. 367-375.
- Meier, A., de Laat, M., Reiche, D., Fitzgerald, D. & Sillence, M. (2019). The efficacy and safety of velagliflozin over 16 weeks as a treatment for insulin dysregulation in ponies. *BMC Veterinary Research*, 15(1):65. doi: 10.1186/s12917-019-1811-2
- Meier, A., Reiche, D., de Laat, M., Pollitt, C., Walsh, D. & Sillence, M. (2018). The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor velagliflozin reduces hyperinsulinemia and prevents laminitis in insulin-dysregulated ponies. *PLOS ONE*, 13(9):e0203655. doi: 10.1371/journal.pone.0203655
- Norton, E. M., Schultz, N. E., Rendahl, A. K., McFarlane, D., Geor, R. J., Mickelson, J. R. & McCue, M. E. (2019). Heritability of metabolic traits associated with equine metabolic syndrome in Welsh ponies and Morgan horses. *Equine Veterinary Journal*, 51(4), pp. 475-480.
- Parsons, C. S., Orsini, J. A., Krafty, R., Capewell, L. & Boston, R. (2007). Risk factors for development of acute laminitis in horses during hospitalization: 73 cases (1997–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(6), pp. 885-889.
- Röder, P. V., Geillinger, K. E., Zietek, T. S., Thorens, B., Koepsell, H. & Daniel, H. (2014). The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLOS ONE*, 9(2):e89977. doi: 10.1371/journal.pone.0089977.
- Sjaastad, O. V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2nd ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Thomas, M. C. & Cherney, D. Z. I. (2018). The actions of SGLT2 inhibitors on metabolism, renal function and blood pressure. *Diabetologica*, 61, pp. 2098-2107.
- Treiber, K. H., Kronfeld, D. S. & Geor, R. J. (2006). Insulin resistance in equids: possible role in laminitis. *The Journal of Nutrition, Oxford Academic*, 136(7), pp. 2094S-2098S.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Ekvint metabolt syndrom, EMS, är en komplex sjukdom som drabbar hästar. Denna sjukdom består av tre delar: onormal fettmetabolism, insulinresistens och ökad risk för fång. Onormal fettmetabolism betyder att dessa hästar kan få fettdepåer som en puckel över mankammen eller mer insprängt med fett över hela kroppen.

Alla kroppens celler behöver energi i form av blodsocker för att kunna fungera normalt. Energin kommer från maten och tas upp från tarmen vidare till blodet. Denna energi, blodsocker, transporteras sedan med blodet ut till kroppens alla celler. För att cellerna ska ta upp energin behövs en signalmolekyl, insulin. Insulin är ett hormon som tillverkas i bukspottskörteln. När bukspottskörteln känner av att nivåerna blodsocker stiger tillverkas mer insulin som frisätts i blodet, vilket då leder till att kroppens celler kan ta upp blodsockret, energin. Hästar med EMS har insulinresistens. Detta innebär att kroppens celler inte svarar normalt på insulin. Cellerna tar ej upp blodsockret och högre nivåer blodsocker gör att bukspottskörteln tillverkar och frisätter mer insulin. Till slut fås mycket höga nivåer av insulin i blodet.

Just höga nivåer av insulin i blodet har stark koppling till att hästar drabbas utav fång. Fång är en inflammation i hovens stödjevävnad. Enkelt beskrivet kan man säga att insulinet orsakar kärlskador och inflammation i hovens stödjevävnad, samt hur dessa celler i stödjevävnaden ser ut. Allt tillsammans ger en mycket smärtsam sjukdom hos hästar och många måste tyvärr avlivas när smärtlindring och antiinflammatoriska mediciner inte räcker till.

Till människor med Diabetes typ 2 finns idag en relativt ny läkemedelsgrupp, SGLT2-hämmare. Dessa mediciner påverkar njuren. Njuren filtrerar blodet för att sedan resorbera de molekyler kroppen vill spara, däribland blodsocker, resten bildar urin och kissas ut. SGLT2-hämmare motverkar resorptionen av blodsocker vilket gör att detta då förloras ut via urinen. Hos människor ses lägre och jämnare nivåer av blodsocker, viktninskning och sänkt blodtryck. Just jämnare nivåer av blodsocker gör det enklare att behandla diabetessjuka med insulin. Men EMS-sjuka hästar behöver ju inte mer insulin, som diabetessjuka människor. Vad händer med hästarnas insulinnivåer i blodet om man med denna medicin lyckas sänka blodsocker?

I denna studie testas två olika doser av SGLT2-hämmare (kanagliflozin) till EMS-sjuka hästar.

Fem hästar med EMS deltog i studien. Hästarna stallades upp på hästkliniken UDS under två olika omgångar. Vid första besöket utfördes bl.a tre olika tester. Ett oralt glukostest (OGT) där hästarna fick glukossirap i munnen till frukost. Dagen efter fick de sitt vanliga foder till frukost, och sista dagen tillfördes glukos (blodsocker) direkt till blodet. Under dessa tester togs blodprover och vi kunde följa blodsocker och insulin.

Efter denna period sattes samtliga hästar på behandling med kanagliflozin (SGLT2-hämmare), två fick en högre dos och tre fick en lägre dos. Hästarna åkte hem och återgick till normala rutiner men fick nu medicin i form av tabletter kl 21.00 varje kväll. Mängden foder som hästarna fick varken ökade eller minskade under denna period.

Efter tre veckor var det dags för hästarna att komma tillbaka till hästkliniken UDS. Nu utfördes samma tester som vid första omgången, med ända skillnad att hästarna fortsatt stod på medicinering.

Resultaten har baserats på de blodprover som togs under det orala glukostestet (OGT). Resultaten visar att samtliga hästar som deltog i studien gick ner i vikt, alla hästar förlorade runt 5 % av sin ursprungliga vikt, oavsett vilken dos av medicinen de stod på. Viktminskningen är till följd av ren energiförlust, dvs fettförbränning.

Precis som hos människa sågs även att blodsockernivåerna sänktes och höll sig mer stabila jämfört med innan behandlingen. Här sågs en dosberoende skillnad och de hästar som behandlades med den högre dosen hade en större sänkning av blodsocker, 42 %, jämfört med hästarna som behandlades med den lägre dosen som fick en sänkning med 16 %. Får vi en lika stor sänkning av insulin?

Nej, sänkningen av insulinnivåerna blev ännu större! Hästarna som behandlades med den högre dosen fick en sänkning av insulinnivåerna på 82 %, och hästarna som behandlades med den lägre dosen fick en sänkning av insulinnivåerna på 62 %. Hos hästarna med den högre dosen ses en dubbelt så bra procent när man jämför blodsocker mot insulin (42 % jämfört med 82 %), samma jämförelse hos hästarna med den lägre dosen är nästan fyrfaldig (16 % jämfört med 62 %). Något annat tycks påverka insulinet ytterligare vilket gör att dessa stora sänkningar i insulin ses.

Troligt är att medicinen som användes, kanagliflozin, inte bara påverkar njuren att förlora glukos ut i urinen, utan även upptaget av socker från tarmen. Exakt hur detta sedan påverkar bukspottskörteln att tillverka och frisätta insulin är oklart, men effekten ses som positiv när det kommer till behandling av EMS-sjuka hästar.

En negativ påverkan av behandlingen som upptäcktes i samband med blodprovstagning är att levern får arbeta ganska hårt. Det sågs förhöjda levervärden hos vissa hästar vilket kan tyda på leverskada. Om detta är till följd av medicinen i sig, eller den ökade fettförbränningen går inte att avgöra i denna studie.

Slutligen har SGLT2-hämmare en framtid som behandling av EMS-sjuka hästar och motverkandet av fång. Flera studier krävs dock, där fler hästar deltar, och under en längre tid. Ska EMS-sjuka hästar behandlas med SGLT2-hämmare är detta högst troligt en livslång behandling så både effekter och biverkningar måste studeras vidare.

Bilagor



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Institutionen för kliniska vetenskaper
Johan B, Katarina N och Sanna TL

1(3)

DNR: 5.8 18-09082/2020
Exp. 2025-05-28

2020-05-28

Forskningsprojekt:
Utvärdering av en ny medicinsk
behandling av hästar med EMS

Djurägarmedgivande

Utvärdering av en ny medicinsk behandling av hästar med EMS

Bakgrund till studien

Hästar med ekvint metabolt syndrom (EMS) har en kraftig insulinfrisättning från bukspottkörteln efter utfodring. Insulinnivåerna i blodet kan vara så höga att de är toxiska för hästen varvid hästen utvecklar fäng. I dagsläget försöker man minska insulinsvaret genom att utfodra hästen med fodermedel som innehåller lite socker. Tidigare forskning vid Sveriges lantbruksuniversitet har visat att dessa åtgärder oftast inte är tillräckliga. Medicinsk behandling av hästar med EMS, som syftar till att sänka insulinsvaret efter utfodring, är därför av stort intresse. En ny generation läkemedel, som sänker blodglukoskoncentrationen, har börjat användas till människor med diabetes. Preliminära studier på häst har visat att dessa läkemedel kan vara effektiva för att sänka insulinsvaret hos hästar med EMS efter utfodring. Studierna har gjorts på substanser som inte finns som inregistrerade läkemedel. Kanagliflozin är en aktiv substans som ingår i det i Sverige inregistrerade läkemedlet Invokana (tabletter).

Syftet med studien

Syftet i studien är att undersöka om behandling med kanagliflozin (Invokana) minskar insulinsvaret hos hästar med EMS.

Försöksupplägg

Din häst har tidigare diagnosticerats med EMS. Hästen kommer att genomgå följande undersökningar och behandlingar:

Dag 1: Permanentkateter i ena halsvenen läggs.

Dag 2: Efter svält över natten (från kl 22.00) så ges hästen en standardiserad giva av glukossirap på morgonen. Sju små blodprover tas från katetern under totalt 3 timmar.

Dag 3: Efter svält över natten (från kl. 22.00) så utfodras hästen med en standardiserad giva med grovfoder på morgonen. Tio små blodprover tas från

katetern under totalt 5 timmar. En permanentkateter läggs i den andra halsvenen på kvällen. Hästen skall vara utan foder 8 timmar under natten.

Dag 4: Hästen tillförs glukos kontinuerligt till blodet under totalt 4 timmar. Tillförseln av glukos ökas i små steg under den här tiden. Små blodprover tas var 10:e minut. När testet är klart avlägsnas båda katetrarna.

Dag 5 – 25: Hästen behandlas med kanagliflozin (Invokana tabletter) eller ingår som kontrollhäst utan behandling. På kvällen dag 25 läggs en permanentkateter och hästen får svälta över natten från kl. 22.00.

Dag 26: Som för dag 2 men hästen behandlas med kanagliflozin eller är obehandlad om den var kontrollhäst.

Dag 27: Som för dag 3 men hästen behandlas med kanagliflozin eller är obehandlad om den var kontrollhäst.

Dag 28: Som för dag 4 men hästen behandlas med kanagliflozin eller är obehandlad om den var kontrollhäst. Permanentkatetrarna avlägsnas och hästen är färdig i försöket.

Läkemedel, provtagningar och analyser, som ingår i försöket, är kostnadsfria.

Vad kommer resultaten att användas till?

Proverna kommer att ligga till grund för att vi i framtiden skall kunna upprätta en bra behandling för hästar med EMS. Som djurägare delges du resultaten från din hästs undersökningar. Vi kommer också förklara vad resultaten betyder för din häst och hur du bör sköta den på bästa sätt för att undvika fäng i framtiden.

Kontakt

Tvcka inte att vid minsta fundering kontakta någon av oss som arbetar i projektet!

Johan Bröjer, Leg. vet.
Johan.brojer@slu.se
018-671388

Katarina Nostell, Leg. vet.
Katarina.nostell@slu.se
018-671356

Sanna Truelsen Lindåse, Leg. vet.
Sanna.lindase@slu.se
018-671395

Institutionen för kliniska vetenskaper, Sveriges lantbruksuniversitet
Box 7054, 750 07 UPPSALA

Djurägarmedgivande

Jag har tagit del av informationen om studien "Utvärdering av en ny diagnostisk metod för att undersöka betacellernas insulinfrisättning hos häst". Härmed godkänner jag att min häst deltar i studien. Jag är införstådd med att deltagandet är frivilligt och att jag när som helst kan ta min häst ur studien. Om jag vill avbryta deltagandet meddelar jag projektansvariga detta. Kostnaderna för uppställning vid kliniken och provtagningen i form av material och analyser, som krävs för försöket, betalas genom forskningsmedel.

Jag ger min tillåtelse att insamlad information och tagna prover får användas i forskningssyfte. Jag ger också tillåtelse att hästen får fotograferas och bilderna användas i forskning eller vid forskningsredovisning. Jag tillåter att projektgruppen kontakter mig igen senare längre fram för en uppföljning om detta skulle vara aktuellt.

Djurägare:

Förnamn, efternamn: _____

Adress: _____

Postnummer, ort: _____

Hemtelefon, mobil: _____

Mailadress: _____

Häst:

Tiltalsnamn: _____

Registreringsnummer: _____

Ort, datum

Namnunderskrift djurägare

Namnförtydligande